microRNA 抽出キット

miRNA Isolation Kit

目次

基本データ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・3
キットの内容・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・3
操 作 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・4

株式会社チヨダサイエンス

本製品は、microRNA を含む small RNA を組織や培養細胞から精製します。miRNA の精製は、遺伝子発現抑制のメカニズムの研究に重要です。
トータル RNA や mRNA 抽出の標準的なプロトコルでは、miRNA を抽出するためには最適化されておらず、十分に回収することができません。大きな RNA 分子を取り除くことは、mRNA 発現分析を qPCR やマイクロアレイを行う上で重要です。
本製品はその他の RNA やゲノム DNA によるコンタミを最小限に抑え small RNA を精製するために最適化し、夾雑物を最小限にするようにデザインしています。カオトロピック塩存在下で RNA が結合するシリカ繊維基質のスピンカラムと異なったエタノール濃度で分子量の違いによるシリカに対する選択的結合性を利用し miRNA を精製します。

基本情報

サンプル	操作時間
100mg 組織 1×10^6 培養細胞	30 分程度

キットの内容

	FAMIK 001 (100 rxn)
Lysis Buffer	25 ml
2M NaOAc, pH5.2	2.5 ml
Wash Buffer	25 ml
Release Buffer	5.5 ml
RNA Column	200 pcs
Collection Tube	200 pcs

その他必要試薬・機器

エタノール
イソプロパノール
クロロホルム
飽和フェノール
遠心分離機
ウォーターバス、またはドライバスなど

操作

＊Release Buffer を 65℃に温めておいてください。

1. 100 mg の組織または、1×10^6 のペレット化した培養細胞に200μｌの Lysis Bufferを加えます。

2. ボルテックスでよく混和し、室温で 10 分間静置します。

3. 20μｌの 2M　NaOAc, pH5.2 を加えます。

4. 180μｌの飽和フェノールと40μｌのクロロホルムを加え、2 分間ボルテックスでよく混和します。

5. 12,000 rpm で 3 分間遠心分離し、上清を新しいチューブへ移します。

6. 35％量のエタノールを加えよく混和します。
   （200μｌの上清へ 108μｌのエタノールを加えてください。）
   *計算式： X を加えるエタノール量とします。（200+X）0.35=X　X=107.6

7. RNA Column を Collection Tube へ取り付けます。
   サンプルを加え、1 分間インキュベートします。

8. 12,000rpm で 30 秒間遠心分離します。

9. ろ液へ 70%量のエタノールを加えよく混和します。
   （290μｌの上清へ 677μｌのエタノールを加えてください。）
   *計算式　X を加えるエタノール量とします。（290+X）0.7=X　X=6776.6

10. 別の新しい RNA Column を Collection Tube へ取り付けます。
    サンプルを加え、1 分間インキュベートします。

11. 12,000rpm で 30 秒間遠心分離します。（miRNA はカラムへ結合します。）

12. 200μｌの Wash Buffer を加え、1 分間インキュベートします。

13. 12,000rpm で 1 分間遠心分離し、カラムを乾燥させます。

14. RNA Column を 1.5ml チューブへ(お客様でご用意ください)取り付けます。

15. 50μｌの Release Buffer (事前に 65℃へ温めてください)をカラム中央へ加え、3 分間インキュベートします。

16. 12,000rpm で 3 分間遠心分離し、miRNA を溶出します。さらに精製を行う場合は、エタノール沈殿を行い、ddH_2O, TE などに溶解してください。

17. 1/5 量のミニアガロースゲルまたは、ポリアクリルアミドゲルで泳動し、確認を行います。tRNA を含む多くの RNA は 100nt 部分に確認できます。5S と 5.8S rRNA も確認できます。tRNA や smallRNA は、はっきり確認できますが、miRNA(21-22nt)はゲル上では確認することはできません。

日本総代理店

株式会社　チヨダサイエンス

〒101-0044　東京都千代田区岩本町 2-13-11　TEL: 03 (3864) 7701　FAX: 03 (3864) 7752

E-mail: technical@chiyoda-s.jp

vol.0912

http:www.chiyoda-s.jp